

特 許 協 力 条 約

P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 22 APR 2004

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 PCTJP20007	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO3/02833	国際出願日 (日.月.年) 11.03.2003	優先日 (日.月.年) 11.03.2002
国際特許分類 (IPC) Int. Cl ⁷ C12N15/53, C12N9/14, C12P7/50, C12N1/15		
出願人 (氏名又は名称) トヨタ自動車株式会社		

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 5 ページからなる。
☒ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で 2 ページである。
- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
 - ☒ 国際予備審査報告の基礎
 - ☐ 優先権
 - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
 - ☐ 発明の単一性の欠如
 - ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
 - ☐ ある種の引用文献
 - ☐ 国際出願の不備
 - ☒ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 12.09.2003	国際予備審査報告を作成した日 05.04.2004	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 新留 豊	4B 9639
電話番号 03-3581-1101 内線		3448

様式PCT/IPEA/409 (表紙) (1998年7月)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☐ 出願時の国際出願書類

☒ 明細書 第 1-31 ページ、
明細書 第 _____ ページ、
明細書 第 _____ ページ、

出願時に提出されたもの
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
付の書簡と共に提出されたもの

☒ 請求の範囲 第 2, 3, 16-18 項、
請求の範囲 第 _____ 項、
請求の範囲 第 _____ 項、
請求の範囲 第 1, 4-7 項、

出願時に提出されたもの
PCT 19条の規定に基づき補正されたもの
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
10.12.2003 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 図面 第 1/15-15/15 ページ/図、
図面 第 _____ ページ/図、
図面 第 _____ ページ/図、

出願時に提出されたもの
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
付の書簡と共に提出されたもの

☒ 明細書の配列表の部分 第 1/22-22/22 ページ、
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、

出願時に提出されたもの
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出された磁気ディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された磁気ディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列と磁気ディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 _____ ページ
☒ 請求の範囲 第 8-15, 19 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1-7, 16-18	有
	請求の範囲		無
進歩性 (IS)	請求の範囲	1-7, 16-18	有
	請求の範囲		無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-7, 16-18	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

(文献)

文献1 : Porro, D. et al., "Development of metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* cells for the production of lactic acid" *Biotechnol. Prog.*, (1995), Vol.11, pp.294-298

文献2 : Kellermann, E. et al., "Analysis of the primary structure and promoter function of a pyruvate decarboxylase gene (PDC1) from *Saccharomyces cerevisiae*" *Nucleic Acids Res.*, (1986), Vol.14, No.22, pp.8963-8977

文献3 : Adachi, E. et al., "Modification of metabolic pathways of *Saccharomyces cerevisiae* by the expression of lactate dehydrogenase and deletion of pyruvate decarboxylase genes for the lactic acid fermentation at low pH value" *Journal of Fermentation and Bioengineering*, (1998), Vol.86, No.3, pp.284-289

文献4 : Bloxham, D.P., "Modification of pig heart lactate dehydrogenase with methyl methanethiosulphonate to produce an enzyme with altered catalytic activity" *Biochemical Journal*, (1977) Vol.161, No.3, pp.643-651

文献5 : Ishiguro, N. et al., "Primary structure of bovine lactate dehydrogenase-A isozyme and its synthesis in *Escherichia coli*" *Gene*, (1990), Vol.91, pp.281-285

(説明)

文献1及び文献3には、ウシ (bovine) LDH-Aの遺伝子で *Saccharomyces cerevisiae*を形質転換し、乳酸の生産に使用したことが記載されている。また文献3には、乳酸の生産効率を向上させるため、宿主のpyruvate decarboxylase (PDC) 遺伝子 (PDC1及びPDC5)を破壊したことも記載されている。

(以下、補充欄に続く)

Ⅷ. 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付についての意見を次に示す。

請求の範囲 1 - 3 及び 1 6 に記載の「ホモログ」について、その範囲が不明確であり、また、具体的なホモログの開示もなされていない点、十分な裏付けをも欠くものと認められる。

この点、出願人は明細書段落 0 0 1 1 等に定義がなされていると主張するが、該「定義」そのものが多義的な解釈を許容しているので、上記主張は適切でないと判断しうる余地がなお存在する。

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 V 欄の続き

(説明)

文献1及び文献3には、ウシ (bovine) LDH-Aの遺伝子で *Saccharomyces cerevisiae*を形質転換し、乳酸の生産に使用したことが記載されている。文献1には、遺伝子導入されるLDH-Aのpyruvateに対する親和性が、PDCのそれと比べ高いため、該親和性の差を利用して、効率よくpyruvateを乳酸に変換しうることが教示されている。文献1及び文献3で使用されたウシLDH-A遺伝子は、文献5に記載されたものであり、そのアミノ酸配列は本願の配列番号1に相当する。

文献2には、*Saccharomyces cerevisiae*のPDC1プロモーター、及びそのコドン用法が記載されている。

文献4には、pyruvateに対する親和性が非常に高い ($40 \mu\text{M}$) LDHを用いることが記載されている。

さらに文献3には、乳酸の生産効率を向上させるため、宿主のpyruvate decarboxylase (PDC) 遺伝子 (PDC1及びPDC5) を破壊したことも記載されている。

これらの公知事実から、上記ウシLDH-Aのプロモーターとして、宿主として想定される*Saccharomyces cerevisiae*由来のPDC1プロモーターを選択し、また宿主のコドン用法を用いることは、当業者が容易になし得ることと一見思われる。さらに、宿主のpyruvate decarboxylase (PDC) 遺伝子の幾つか (PDC1及びPDC5) を別途、破壊することも、当業者に自明とも思われる。

しかしながら、補正後の請求の範囲1は、宿主染色体上の上記プロモーターにより導入されるLDH遺伝子を制御せしめることを構成としており、10、12、2003付けの答弁書によれば、この構成の前提として、LDH遺伝子は宿主染色体上で本来PDC遺伝子が存在していた領域に、相同性組換えを用いることによりPDC遺伝子に代わって組み込まれているとのことである。

一方、文献1、3には2 μm DNAによるプラスミド型での形質転換手法が記載されているが、相同性組換えにより、宿主PDC遺伝子の破壊と外来LDH遺伝子の導入を同時に行うことについては、記載も示唆もされていない。

さらにその効果として、本願明細書の表3にはLDH遺伝子の染色体組み込みによるL-乳酸の生産量が示されているが、上記答弁書にはこのデータと上記プラスミド型の形質転換を行った場合の生産量との比較がなされており、乳酸菌由来のLDHを導入した場合は0.55%、ウシ由来のLDHを導入した場合は0.60%であると示されている。したがって、本願の形質転換手法を用いた場合には、格別有意な効果を認めることができる。

以上より、請求の範囲1は進歩性を有し、同様に請求の範囲2-7、16-18も進歩性を有する。

請求の範囲1-7、16-18は産業上利用性を有する。

請求の範囲

1. (補正後) 宿主生物に内在するピルビン酸脱炭酸酵素の対ピルビン酸基質親和性と同等かあるいはそれを超える対ピルビン酸基質親和性を備える外来の乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAが導入されている形質転換体であって、前記外来タンパク質をコードするDNAは、宿主染色体上のピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子のプロモーターあるいは当該プロモーターと置換された当該プロモーターのホモログによって制御可能に導入されている形質転換体。
2. 前記外来タンパク質は、ウシ由来の乳酸脱水素酵素あるいはそのホモログである、請求項 1 に記載の形質転換体。
3. 前記外来タンパク質は、配列番号 1 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質あるいはそのホモログである、請求項 1 に記載の形質転換体。
4. (補正後) 前記外来タンパク質は、配列番号 3 に示すDNA配列によってコードされている、請求項 3 に記載の形質転換体。
5. (補正後) 前記外来タンパク質をコードするDNA配列として、配列番号 4 に示すDNA配列を保持する、請求項 4 に記載の形質転換体。
6. (補正後) 前記宿主生物は、サッカロマイセス属である、請求項 1 から請求項 5 のうちいずれか 1 項に記載の形質転換体。
7. (補正後) 前記宿主生物は、サッカロマイセス・セレビシエある、請求項 1 から請求項 5 のうちいずれか 1 項に記載の形質転換体。
8. (削除)
9. (削除)
10. (削除)
11. (削除)
12. (削除)
13. (削除)
14. (削除)
15. (削除)
16. 形質転換体であって、

ウシ由来の乳酸脱水素酵素あるいはそのホモログをコードするDNAが、サッカロマイセス属の宿主染色体上のピルビン酸脱炭酸酵素 1 遺伝子のプロモーターあるいは当該プロモーターと置換された当該プロモーターのホモログによって制御可能に導入されており、宿主染色体上のピルビン酸脱炭酸酵素 1 の構造遺伝子が破壊されている、形質転換体。

17. 前記宿主は、サッカロマイセス・セレビシエである、請求項 16 記載の形質転換体。

18. 請求項 1 に記載の形質転換体を培養する工程と、

前記工程で得られる培養物から乳酸を分離する工程、

とを備える、乳酸の製造方法。

19. (削除)

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/JP2003/002833



PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PCTJP20007	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP2003/002833	International filing date (day/month/year) 11 March 2003 (11.03.2003)	Priority date (day/month/year) 11 March 2002 (11.03.2002)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/53, 9/14, C12P 7/50, C12N 1/15		
Applicant TOYOTA JIDOSHA KABUSHIKI KAISHA		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.
☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 2 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 12 September 2003 (12.09.2003)	Date of completion of this report 05 April 2004 (05.04.2004)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

national application No.

PCT/JP2003/002833

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

☐ the international application as originally filed

☒ the description:

pages 1-31, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

☒ the claims:

pages 2,3,16-18, as originally filed

pages _____, as amended (together with any statement under Article 19

pages _____, filed with the demand

pages 1,4-7, filed with the letter of 10 December 2003 (10.12.2003)

☒ the drawings:

pages 1/15-15/15, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

☒ the sequence listing part of the description:

pages 1/22-22/22, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).

☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).

☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

☐ contained in the international application in written form.

☐ filed together with the international application in computer readable form.

☐ furnished subsequently to this Authority in written form.

☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☒ The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages _____

☒ the claims, Nos. 8-15,19

☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP03/02833

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-7, 16-18	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-7, 16-18	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-7, 16-18	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Documents

Document 1: Development of Metabolically Engineered *Saccharomyces cerevisiae* Cells for the Production of Lactic Acid, (D. Porro, et al.), Biotechnol. Prog., 1996, Vol. 11, pages 294-298

Document 2: Analysis of the Primary Structure and Promoter Function of a Pyruvate Decarboxylase Gene (PDC1) from *Saccharomyces cerevisiae*, (E. Kellerman, et al.), Nucleic Acids Res., 1986, Vol. 44, No. 22, pages 8963-8977

Document 3: Modification of Metabolic Pathways of *Saccharomyces cerevisiae* by the Expression of Lactate Dehydrogenase and Deletion of Pyruvate Decarboxylase Genes for the Lactic Acid Fermentation and Bioengineering, (E. Adachi, et al.), 1998, Vol. 86, No. 3, pages 284-289

Document 4: Modification of Pig Heart Lactate Dehydrogenase with Methyl Methanethiosulphonate to Produce an Enzyme with Altered Catalytic Activity, (D. P. Bloxham), Biochemical Journal, 1977, Vol. 161, No. 3, pages 643-651

Document 5: Primary Structure of Bovine Lactate Dehydrogenase-A Isozyme and Its Synthesis in *Escherichia coli*, (N. Ishiguro, et al.), Gene, 1990, Vol. 91, pages 281-285

Explanation:

Documents 1 and 3 describe that *Saccharomyces cerevisiae* is transformed with bovine LDH-A genes to use it for the production of lactic acid. Document 3 also describes that pyruvate decarboxylase (PDC) genes (PDC1 and PDC5) of the host are destroyed to improve the efficiency of production of lactic acid.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP03/02833

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The scope of the word, "homolog" contained in claims 1-3 and 16 is unclear, and no specific homolog is disclosed, so the word is not adequately supported.

In this respect, although the applicant claims that the word is adequately defined in paragraph [0011], etc., in the specification, the "definition" of that word therein permits ambiguous constructions, and so the claim is still considered to be inadequate.

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of : V

Documents 1 and 3 describe transforming *Saccharomyces cerevisiae* with bovine LDH-A genes to use it for the production of lactic acid. Document 1 taught that LDH-A, genes of which are introduced therein, has a higher affinity with pyruvate than PDC does, and so pyruvate can be efficiently converted into lactic acid by using that difference in the affinity. The bovine LDH-A genes used in documents 1 and 3 are described in document 5 and their amino acid sequence corresponds to SEQ ID NO.: 1 of the present application.

Document 2 describes PDC1 promoter of *Saccharomyces cerevisiae* and its codon usage.

Document 4 describes that (40 μ M) LDH that has a very high affinity with pyruvate is used.

Document 3 also describes that pyruvate decarboxylase (PDC) genes (PDC1 and PDC5) of the host are destroyed to improve the efficiency of production of lactic acid.

Considering these publicly known facts, it appears that a person skilled in the art could have easily selected the PDC1 promoter derived from *Saccharomyces cerevisiae*, which might be assumed to be the host, as a promoter of the above-mentioned bovine LDH-A, and employed the codon usage of the host. In addition, it would seem to have been obvious to a person skilled in the art to destroy some (PDC1 and PDC5) of the pyruvate decarboxylase (PDC) genes in a separate process.

Claim 1 as amended, however, presents a constitution wherein the above-mentioned promoter on chromosomes of the host controls LDH genes introduced. According to the written reply of 10 December 2003, a precondition for the said constitution is that LDH genes have been integrated in substitution for PDC genes on chromosomes of the host into the domain where those PDC genes existed by means of homologous recombination.

On the other hand, documents 1 and 3 describe a plasmid-type technique of transformation with 2 μ m DNA, but do not describe or suggest that PDC genes of the host are destroyed and simultaneously foreign LDH genes are introduced, by means of homologous recombination.

In addition, as its effect, the amounts of L-lactic acid produced by means of the introduction of LDH genes into chromosomes are shown in Table 3 of the present application, and the above-mentioned written reply compares that data with the amounts produced in the case of the said plasmid-type technique of transformation used and indicates 0.55% in the case of the introduction of LDH derived from lactic acid bacteria and 0.60% in the case of the introduction of LDH derived from bovines. Accordingly, it is considered that the transformation technique of the present application has a particularly significant effect.

The subject matter of claim 1 therefore appears to involve an inventive step, and similarly, the subject matters of claims 2-7 and 16-18 also appear to involve an inventive step.

The subject matters of claims 1-7 and 16-18 appear to be industrially applicable.